Beiträge zur Chemie der Polysaccharide.

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
genehmigt
von der Philosophischen Fakultät
der
Friedrich-Wilhelms-Universität zu Berlin.

Vorgelegt von
Paul Ohlmeyer
aus Münster in Westfalen

Tag der mündlichen Prüfung: 21. 7. 1932
Tag der Promotion: 12. 7. 1933

441

Referenten:

Professor Dr. H. Pringsheim

Hofrat Professor Dr. W. Schlenk

*

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Meinen Eltern!

I.

Ueber neue Polyamylosen.

Im Jahre 1930 wurde von Pringsheim[1]) die Beobachtung gemacht, daß schon beim Auflösen der Polyamylosen in kaltem Formamid Umlagerungen eintreten, welche zu neuen Vertretern dieser Körperklasse führen. So konnte aus der Tetraamylose zu 80% ein neuer Vertreter der α-Reihe, das sogenannte α-Amylosan und daneben zu 20% ein neuer Vertreter der β-Reihe, das β-Amylosan, gewonnen werden. Das β-Amylosan wurde auf dieselbe Weise aus der β-Hexaamylose erhalten, ohne daß hierbei ein weiterer Körper entstand. Beide Präparate sind schön krystallisiert, sowie sie in der genannten „Berichte"-Arbeit auf Seite 2631 abgebildet wurden. Dort finden sich auch die Mikrophotogramme der zugehörigen Jodpräparate, welche ganz den charakteristischen Jodprodukten der α - resp. β-Reihe der Polyamylosen entsprechen. Für die Fortführung meiner Arbeit ist noch die Feststellung von Bedeutung, daß das α-Amylosan entsprechend seiner kryoskopischen Molekulargewichtsbestimmung in Wasser sich in diesem Lösungsmittel zu einem Hexoseanhydrid aufteilt.

Ich machte die Beobachtung, daß die geschilderte Umwandlung noch weiter gehen kann, wenn man die Reaktion durch 6-stündiges Erhitzen der in Formamid gelösten Polyamylose auf dem Wasserbade verstärkt. Auf diese Weise gewann ich aus dem vorgenannten α-Amylosan einen neuen Körper, der nicht nur eine verschiedene Krystallstruktur zeigte, sondern besonders auch durch ein Jod-Additionsprodukt von einem völlig neuen Habitus, wie er in der Polyamylosen-Reihe noch nicht beobachtet war, ausgezeichnet ist. Es handelt sich hierbei um schwarzgrüne, dicke prismatische Krystalle im Gegensatz zu den metallglänzenden grünen Nadeln der Jodprodukte der α-Reihe. Zu dem gleichen Körper kam ich auch, wenn ich die Lösung der Tetraamylose direkt in Formamid erhitzte.

Ebenso gewann ich durch Erhitzen von Hexaamylose in Formamid ein analoges Produkt der β-Reihe, das aus wässrigem Alkohol gleichfalls in schön krystallisierter Form zu erhalten war. Beide Körper erhielt ich in 70—80%iger Ausbeute; sie zeigten wieder die Zusammensetzung $C_6H_{10}O_5$ und die für die Polyamylosen charakteristische Eigenschaft, mit organischen Lösungsmitteln, z. B. Tri-

1) H. Pringsheim, A. Wiener und A. Weidinger, Ber. 63, 2628, 1930.

chlorätylen, in Wasser schwerlösliche Additionsverbindungen zu geben.
Die neuen Polyamylosen wurden als α- und ß-Alloamylosan bezeichnet.

Im Gegensatze zu dem interessanten Jodkörper des Alloamylosans gelang es mir nicht, in einwandfreier Weise eine charakteristisches Jodprodukt des β-Körpers zu erhalten, wohl deshalb, weil zusammen mit dem schwarzbraun gefärbten prismatischen Jodkörper beim Erkalten aus konzentrierter wässriger Lösung das in Waser sehr schwer lösliche β-Alloamylosan selbst mit ausfiel.

Wegen der Schwerlöslichkeit ließ sich selbst die spezifische Drehung des β-Körpers in Wasser nicht bestimmen; ich verwandte ein Pyridin-Wassergemisch (7:3) und fand + 146°. Der α-Körper drehte in Wasser + 139°. Sein Molekulargewicht ließ sich kryoskopisch in Wasser einwandfrei entsprechend einem Glucoseanhydrid ermitteln, eine Bestimmung, die natürlich beim β-Körper nicht ausführbar war. Beim Siedepunkt des Wassers gingen beide Substanzen, entsprechend dem allgemeinen Verhalten der Polyamylosen, wie das an der Diamylose[2]) und Triamylose[3]) schon früher ermittelt wurde, in den kolloid-dispersen Zustand über.[4]) Beide Körper verwandelte ich in ihre Acetate, deren Molekulargewicht ich in Dioxan ermittelte. Merkwürdigerweise fand ich in beiden Fällen einen trimeren Wert.

Bekanntlich hat Karrer die Umwandlung der Polyamylosen auf dem Wege über die Acetobrommaltose und die Heptacetylmaltose in Maltose erreicht.[5]) Er ließ zu diesem Zwecke Acetylbromid auf die Polyosen einwirken und behandelte die dabei gebildete Acetobrommaltose durch Schütteln in ätherischer Lösung mit Silbercarbonat; so entstand krystallisierte Heptacetylmaltose, die gewogen und durch Schmelzpunkt und Drehwert identifiziert wurde. Die Ausbeute war bei den Polyamylosen wesentlich geringer als bei der Stärke. Noch niedriger war sie bei den Amylosanen, z. B. 120 mg Heptacetylmaltose aus 1/2 g α-Amylosan. Hier reichte die Substanz zu Mischschmelzpunkts- und Drehungsbestimmung, bei β-Amylosan nur zu ersterer. Der wesentlich interessantere Fall ist der des α-Amylosans: ausgehend von einem Zucker, der in Wasser

---

2) Ber. 56, 1520, 1923.
3) Ber. 55, 1433, 1922.
4) Wegen der experimentellen Einzelheiten vgl. H. Pringsheim u. C. Lamm, Kolloid-Ztschr. 54, 36, 1931.
5) P. Karrer u. C. Nägeli, Helv. chim. Acta 4, 169, 179, 1921.

auf ein Glucoseanhydrid stimmende Werte ergab, entstand nach der Karrer'schen Methode ein Derivat der Maltose, ein sicherer Beweis dafür, daß in der hier eingeleiteten Reaktionsfolge weder bei den Polyamylosen, noch bei der Stärke Maltose im Abbau entstanden ist. Wie schon des öfteren betont, handelt es sich hierbei um eine synthetische Bildung der Maltose aus den labilen γ - glucosidischen Bruchstücken der fraglichen Polyosen, die nicht als Beweis für das Vorhandensein von Maltose-Bindungen in ihnen herangezogen werden darf.

In der vorgenannten Arbeit wurden neben den Amylosanen noch die Isoamylosane beschrieben, welche aus ihnen beim Erhitzen der wässrigen Lösung erhalten wurden, und die sich durch ihr Polymerisationsvermögen bis zu in Wasser kolloidal gelösten hochmolekularen Polyosen auszeichnen.

Die beiden Amylosane und Isoamylosane habe ich noch als Substrat für Fermentversuche benutzt und festgestellt, daß sie weder durch die α-Glucosidase der Hefe, noch die ß-Glucosidase des Emulsins, noch die Malzamylase, dagegen aber durch die in der Takadiastase enthaltenen Fermente gespalten werden. Auch in dieser Beziehung ist das Verhalten dieser Körper ganz analog zu dem der Polyamylosen.[6]) Die Präparate der β-Reihe wurden von den Taka-Fermenten stärker als die der α-Reihe gespalten, in sehr viel höherem Maße ist das bei den β-Amylosan der Fall.

Beschreibung der Versuche.

α-Allo-amylosan.

3 g α-Tetraamylose wurden ½ Stde. bei 78° über P_2O_5 getrocknet, dann in 100 ccm Formamid (Schmp. + 2°) gelöst. Diese Lösung wurde 4 Stdn. am Rückflußkühler im Vakuum gekocht und das entstandene Allo-amylosan mit einer Alkohol-Aether-Mischung ausgefällt. Die abgesaugte Substanz wurde mit Alkohol gewaschen, aus verdünntem Alkohol mehrmals umkrystallisiert und über P_2O_5 bei 78° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

4.532 mg Sbst.: 7.315 mg CO_2, 2.58 mg H_2O. Gef.C 44.03, H 6.37.

$[\alpha]_D^{20}$ = (5 × + 0.57°) : (0.5 × 0.0410) = + 139° (in Wasser)
(weitere Werte: + 141°, + 138°)

Die Molekulargewichtsbestimmung nach der Gefrierpunktsmethode in Wasser ergab:

0.1135, 0.2288 g Sbst. in 15 g Lösungsmittel: △ = 0.076°, 0.129°.

---

6) Ber. 46, 2959, 1913; 59, 2738, 1926.

Molgew. ber. 162, gef. 184, 215.

Beim Versuch, das Molekulargewicht von α-Alloamylasan nach der Siedepunktsmethode in Wasser zu bestimmen, ergab sich in ca. 6-proz. Lösung eine Depression.

β-Allo-amylosan.

ß-Allo-amylosan wurde auf dieselbe Weise wie α-Alloamylosan aus β-Hexaamylose dargestellt und getrocknet.

4.600 mg Sbst.: 7.480 mg CO_2, 2.67 mg H_2O. Gef. C 44.36. H 6.50

$[\alpha]_D^{20} = (5 \times + 0.77^0) : (0.5 \times 0.0524) = 146^0$ (in Pyidin-Wasser [7 : 3])

(weiterer Wert + 144°)

Beide Präparate wurden mit der üblichen Pyridin-Essigsäureanhydrid-Mischung acetyliert und die aus Toluol umkrystallisierten Produkte analysiert.

α-Allo-amylosan-acetat.

5.437 mg Sbst. : 9.990 mg CO_2, 2.715 mg H_2O. Gef. C 50.2, H 5.58

$[\alpha]_D^{20} = (5 \times + 3.6^0) : (0.5 \times 0.0320) = + 112^0$ (in Chloroform)

(weiterer Wert: + 113°).

0.1430 mg Sbst. in 15 g Dioxan: $\Delta = 0.054^0$. Molgew. ber. auf 3 × C_6 864, gef. 874.

β-Allo-amylosan-acetat.

4.947 mg Sbst.: 9.030 mg CO_2, 2.340 mg H_2O. Gef. C 49.8, H 5.29.

$[\alpha]_D^{20} = (5 \times + 5.1^0) : (0.5 \times 0.0412) = + 124^0$ (in Chloroform)

0.1436, 0.2400 g Sbst. in 15.0 g Dioxan: $\Delta = 0.060^0, 0.090^0$. Molgew. ber. auf 3 × C_6 864, gef. 790, 880.

Heptacetyl-maltose aus α- und β-Amylosan.

0.5 g α-Amylosan wurden in einem kleinen Rundkolben, der mit einem Chlorcalcium-Rohre versehen war, mit 50 ccm Acetylbromid übergossen, anfangs mit Eis gekühlt und dann bei Zimmertemperatur so lange stehen gelassen, bis der größte Teil des Amylosans in Lösung ging, was nach ca. 5 Stdn. der Fall war. Die so entstandene trübe Lösung wurde in Eiswasser gegossen. Es fiel dabei ein weißer, amorpher Körper aus, die Aceto-brommaltose. Nach dem Absaugen wurde die noch feuchte Substanz in Aether gelöst und mit frisch gefälltem Silbercarbonat 2 Stn. geschüttelt. Die

Heptacetylmaltose scheidet sich dabei aus und wird zusammen mit den Silberrückständen abgenutscht und die ganze Reaktionsmasse während mehrerer Stunden mit viel Chloroform gekocht. Die abfiltrierte Chloroform-Lösung der Heptacetylmaltose wird zur Trockne verdampft und der rohe Rückstand aus Alkohol mehrmals umkrystallisiert. Ausbeute an reiner Heptacetylmaltose: 120 mg. Der Schmp. 178—179°, Misch-Schmp. 176°.

$[\alpha]_D^{20} = (5 \times + 0.38^0) : (0.5 \times 0.050) = + 76^0$ (in Acetylentetrachlorid).

0.5 g β-Amylosan habe ich auf dieselbe Weise verarbeitet. Die Reaktion geht dabei viel schneller vor sich, was auch durch Einstellen in Eiswasser nicht verhindert werden kann. Die Ausbeute an Heptacetyl-maltose war so gering, daß ich auf eine Drehungsbestimmung verzichten und mich nur auf die Identifizierung durch Schmp. (177°) und Misch.-Schmp. (176—177°) beschränken mußte.

Ferment-Versuche.

	α—Glucosidase	β—Glucosidase	Malz-Amylase	Taka-Diastase
α—Amylosan	—	—	—	+
β—Amylosan	—	—	—	+
α—Iso-amylosan	—	—	—	+
β—Iso-amylosan	—	—	—	+

α- und β-Glucosidase wurden gegen Maltose resp. Milchzucker, Malzamylase gegen Stärke geprüft.

Im folgenden gebe ich die Daten der Spaltungsversuche mit Taka-Diastase:

Die Stammlösungen: α-Amylosan 0.4942 g, β-Amylosan 0.4997 g, α-Iso-amylosan 0.5004 g in je 50 ccm, und β-Iso-amylosan 0,3150 g in 30 ccm Wasser. Von diesen Lösungen wurden je 5 ccm genommen und mit je 2 ccm dialysierter Lösung von 120 mg Taka-Diastase in 40 ccm Wasser und 3 ccm Pufferlösung (P_H = 4.5) 24 Stdn. bei 37° stehen gelassen. Titration mit 1/50 n. Kaliumpermanganat.

	mg Cu	mg Zucker	% Spaltung
α—Amylosan	4,4	2,2	4,4
β—Amylosan	41,3	20,6	41,2
α—Iso-amylosan	3,8	1,9	3,7
β—Iso-amylosan	40,0	20,0	38,1

In einer anderen Versuchsreihe habe ich die Versuche mit der doppelten Menge Taka-Diastase während 48 Std. durchgeführt und folgende Resultate erzielt.

	mg Cu	mg Zucker	% Spaltung
α—Amylosan	8,9	4,6	9,3
β—Amylosan	55,6	28,1	56,3
α—Iso-amylosan	8,5	4,4	8,7
β—Iso-amylosan	54,0	27,3	52,0

II.

Ueber Inulin und die Inulinase.

Die von verschiedener Seite[1]) mitgeteilte Beobachtung, daß bei der sauren Hydrolyse des Inulins eine gewisse Menge Glucose entsteht, wurde vor einiger Zeit[2]) unter Mitarbeit von Herrn Hensel auf den fermentativen Abbau des Inulins ausgedehnt. Hierbei sollte die Frage geprüft werden, ob die Glucose ein natürlicher Begleiter der h-Fruktose unter der Einwirkung der Säure sei. Diese Versuche ergaben, daß durch die Inulinase des Aspergillus niger ca. 90% des Inulins verzuckert werden konnten, daß aber im Ferment-Hydroysat keine Glucose vorhanden war.

Um dieses Ergebnis auf eine sichere Grundlage zu stellen und Versuche mit dem fermentativ nicht hydrolysierbaren Rückstande des Inulins ausführen zu können, wurde bei der Suche nach größeren Mengen aktiver Inulinase es am besten gefunden, von Massenkulturen des Aspergillus niger auszugehen[3]). Der rohe Fermentextrakt der Mycelien des Aspergillus war jedoch reichlich durch Eiweißstoffe verunreinigt, vor allem aber enthielt er nicht unbeträchtliche Mengen Mannit, welche nach den Angaben der Literatur[4]) von Aspergillus-Arten gebildet werden.

Um mich von diesen Fehlerquellen zu befreien, bin ich zur Reinigung und Anreicherung der Inulinase aus den Massenkulturen des Aspergillus übergegangen. Mit elektroosmotisch gereinigtem Kaolin wurde keine Adsorption des Fermentes erzielt. Die Aluminiumhydroxyde A und B nach Willstätter gestatteten die Herausnahme des Fermentes aus dem Pilzauszug im Zustande seiner ursprünglichen Pufferung von P_H 3.8, und zwar ließ sich mit B

1) Schlubach u. Elsner, Ber. *62*, 1493, 1929; Jackson u. Goergen, Bureau of Standards Journ. Research *3*, *27*, 1929.
2) Pringsheim u. Reilly, Ber. *63*, *2636*, 1930.
3) Pringsheim u. Hensel, Ber. 64, 1431, 1931.
4) Czapek, Biochemie der Pflanzen, II. Auflage 1913, Bd. 1, S. 298.

eine vollkommene Adsorption erreichen. Hierzu genügten auf 10 ccm ca. 50 mg Aluminiumhydroxyd B. Um das Ergebnis der Elution aus dem Ferment-Adsorbat zu beurteilen, habe ich eine Inulinase-Einheit (I.A.) eingeführt und als solche diejenige Menge Ferment festgelegt, welche imstande ist, in drei Stunden bei 37° 150 mg Inulin in 1%iger Lösung zu 30% zu spalten.

Die Elution gelang am besten mit Phosphatpuffer von P_H 6.8, und zwar ohne Fermentverlust mit dem gleichen und dem halben Volumen des Pilzextraktes, was im zweiten Falle einer Anreicherung auf das Doppelte entspricht. Bei Verminderung der Elutionsflüssigkeit auf den vierten Teil der rohen Fermentflüssigkeit trat schon ein beträchtlicher Verlust an Ferment ein. Da eine stärkere Anreicherung für meine chemischen Zwecke weniger bedeutungsvoll war als die Verwendung einer möglichst salzarmen Elutionsflüssigkeit, bin ich zu Versuchen mit wässrigem Ammoniak übergegangen. Da das Adsorbat durch Waschen mit Wasser nicht ohne einen sehr großen Fermentverlust vom anhaftenden Puffer befreit werden konnte, nahm ich die Elution mit wässrigem Ammoniak von der Acidität 8,4 vor, um auf diese Weise in die Elutionsflüssigkeit ein P_H 6.8 zu bekommen. Bei Verwendung des gleichen Volumens Elutionsflüssigkeit verzeichnete ich einen Fermentverlust auf $^2/_3$ des ursprünglichen, befand mich nun aber im Besitze einer sehr reinen Enzymlösung.

Mit den gereinigten Fermentlösungen gelang die Spaltung des Inulins in noch wesentlich größerem Maßstabe als mit dem Rohextrakt des Pilzmycels; diese mag zum Teil darauf zurückzuführen sein, daß die Beständigkeit des gereinigten Fermentes eine erhöhte ist. Während ich früher mit dem Pilzmycel, herangezogen auf 10 l Nährlösung, zu einer Spaltung von ca. 20 g Inulin gelangte, erzielte ich mit dem gereinigten Fermente jetzt eine maximale Hydrolyse von bis zu 40 g Inulin in 48 Stunden.

Unter genauer Berücksichtigung des Wassergehaltes des eingebrachten Inulins und des Kupferwertes der Fruktose[5]), den ich nachprüfte, berechnete sich die Inulin-Hydrolyse bis zu 95%. In diesen 95% war nach der Differenz-Titration zwischen Fehlingscher Lösung und Hypojodid eine geringe Menge Glucose vorhanden, die ich im Durchschnitte zu 1,5% des Inulins fand, und zwar geprüft am Inulin aus Detroit, aus denen bei der Säure-Hydrolyse nach den

5) Rohny, Biochem. Z. 199, 53, 1928.

Angaben von Schlubach[6]) und Jackson[7]) mindestens 3% Glucose gebildet worden war. Um dieses Resultat weiter zu sichern, versuchte ich zuerst die Menge der gebildeten Fruktose neben der Glucose nach der kolorimetrischen Methode von Bredereck[8]) zu bestimmen. Mit reiner Fruktose läßt sich das Verfahren offenbar gut zur Ausführung bringen, in Gegenwart von Phosphatpuffer ist es selbstverständlich nicht anwendbar, aber selbst meine schon so sehr reine Ammoniak-Elution hatte aus dem Adsorbat offenbar noch Verunreinigungen, wahrscheinlich Eiweißstoffe, wenn auch in sehr geringen Mengen, übernommen, deretwegen die Kolorimetrie der Fruktose nicht anwendbar war. Dagegen gelang es mir nach entsprechender Reinigungsoperation (vgl. Versuchsteil) 83% der Fruktose aus dem Hydrolysat krystallinisch zu gewinnen und als Fruktose zu charakterisieren. In der Mutterlauge hatte sich nun Glucose angereichert, die in entsprechender Weise durch Differenz-Titration und Drehungsbestimmung nachweisbar war und auf das Inulin bezogen wieder 1,5% ausmachte.

Es steht aber immer noch die Möglichkeit offen, daß ein Teil der Glucose in den 5% nicht hydrolysierten Inulin-Rückständen geblieben ist. Ausgehend von größeren Inulin-Ansätzen bis zu 60 g, in denen ein Rückstand von 3 g hinterblieb, bemühte ich mich nach der von Jackson beschriebenen Methode nach den entsprechenden Reinigungen durch Acetylierung sein Difruktose-Anhydrid I, das ich in den Händen hatte, zu isolieren. Dies ist mir jedoch nicht gelungen. Wenn ein negativer Versuch auch keine endgültige Bedeutung hat, so bin ich doch der Meinung, daß der fermentative Inulin-Abbau wohl andere Wege beschritten hat als der Säure-Abbau, da mir das leicht krystallisierende Acetat von Jackson schwer hätte entgehen können. Es besteht die Möglichkeit, daß bei der Fermentspaltung des Inulins ein durch die Hefe-Fermente aufspaltbarer Rückstand hinterbleibt, der somit der Vergärung durch die Hefe unterliegen mußte.

Deshalb ist es also geboten, sich der Meinung von Haworth und Streight[9]) anzuschließen, daß die von Jackson isolierten Difruktoseanhydride erst während der Säurehydrolyse entstanden sind.

---

6) Schlubach u. Elsner, Ber. 62, 1493, 1929.

7) Jackson u. Goergen, Bureau of Standards Journ. Research 5, 1151, 1930.

8) Ber. 64, 1730, 1931.

9) Helv. 15, 695, 1932.

Beschreibung der Versuche.

Inulinase-Einheit.

Ich züchtete auf 10 l Nährlösung in 8 Glasschalen von der Größe 19×25 cm einen Pilzrasen von Aspergillus niger heran, aus dem ich mit Citrat-Salzsäure-Puffer von P_H 3.8 500 ccm Extrakt unter hydraulischem Pressen bis zu 300 Atm. gewann.

10 ccm einer 1½%igen Inulinlösung, 5 ccm Preßsaft, Versuchstemperatur 38°. 5 ccm wurden nach Folin und Wu enteiweißt und nach Bertrand titriert.

Zeit in Stunden	mg Cu	% Spaltung
0	—	—
3	32,0	30

Fermentadsorption mit Kaolin und Aluminiumhydroxyd A und B.

1. 10 ccm Preßsaft wurden mit 80 mg elektroosmotisch gereinigtem Kaolin 10 Min. geschüttelt, dann wurde zentrifugiert.

Ansatz: 10 ccm Inulinlösung, 5 ccm des Zentrifugates. 5 ccm wurden titriert.

Zeit in Stunden	mg Cu	% Spaltung
0	—	—
3	32,0	30

2. 10 ccm Preßsaft wurden mit einer Suspension von 80 mg Aluminiumhydroxyd A in 3 ccm Wasser 25 Min. geschüttelt und dann zentrifugiert.

Ansatz: 10 ccm Inulinlösung, 5 ccm Zentrifugat.

Zeit in Stunden	mg Cu	% Spaltung
0	—	—
3	6,7	6

3. 10 ccm Preßsaft wurden mit 80 mg Aluminiumhydroxyd B (suspendiert in 5 ccm Wasser) 25 Min. geschüttelt und darauf zentrifugiert.

Ansatz: 10 ccm Inulinlösung, 5 ccm Zentrifugat.

Zeit in Stunden	mg Cu	% Spaltung
0	—	—
3	—	—

Es zeigte sich also, daß das Zentrifugat vom Aluminiumhydroxyd keine Spaltung bewirkt hat und somit die Inulinase quantitativ adsorbiert war. Zur Ermittelung der Mindestmenge dieses Adsorbens, die das Ferment noch total festhält, diente folgende Versuchsreihe:

10 ccm Preßsaft wurden mit je 4, 3 und 2 ccm der B-Suspension (80 mg in 5 ccm) und 1 bzw. 2, bzw. 3 ccm Wasser geschüttelt und zentrifugiert.

Ansatz: 10 ccm Inulinlösung, 5 ccm Zentrifugat.

Zeit in Stunden	mg Cu	% Spaltung
0	—	—
3	bei B4) —	bei B4) —
	„ B3) —	„ B3) —
	„ B2) 5,8	„ B2) 5

Die Grenze lag also bei 3 ccm Suspension, bzw. bei 48 mg Aluminiumhydroxyd.

Elution und Anreicherung mit Phosphat.

20 ccm Preßsaft wurden durch Schütteln an 96 mg Aluminiumhydroxyd B adsorbiert und darauf dekantiert; das Adsorbat wurde mit 20 ccm einer Phosphatlösung von P_H 6.8 (davon 4 ccm n/10 prim. Natriumphosphat und sek. Kaliumphosphat zu gleichen Teilen) wieder aufgeschlemmt, 20 Minuten geschüttelt und zentrifugiert.

Ansatz: 10 ccm vom Zentrifugat, 0,68 ccm n/10 HCl (Resultat: P_H 3.8) und 300 mg Inulin (berechnet auf wasserfreies Inulin) wurden mit Wasser auf 30 ccm aufgefüllt.

Zeit in Stunden	mg Cu	% Spaltung
0	—	—
3	27,2	27

Es ergibt sich also, daß ca. 9% des Fermentes durch die Elution verloren gegangen waren.

Die Anreicherung auf das Doppelte wurde mit Hilfe des folgenden Ansatzes erreicht:

30 ccm Preßsaft wurden an 144 mg Aluminiumhydroxyd adsorbiert. Die Elution geschah auf die oben beschriebene Weise mit 15 ccm Flüssigkeit, die 3 ccm Phosphat-Stammpuffer enthielt.

Ansatz: 10 ccm vom Zentrifugat wurden mit 0,68 ccm n/10 HCl auf P_H 3,8 umgestellt und mit 300 mg Inulin auf 30 ccm aufgefüllt.

Zeit in Stunden	mg Cu	% Spaltung
0	—	
3	63,4	62

Elution mit Ammoniak.

50 ccm Preßsaft wurden mit 240 mg Aluminiumhydroxyd adsorbiert. Das Adsorbat schüttelte ich mit 50 ccm Ammoniakwasser vom P_H 8,4, wobei ein P_H von 6,8 resultierte. Dann wurde 20 Minuten zentrifugiert.

Ansatz: 10 ccm Zentrifugat mit 0,28 ccm n/10 HCl (zusammen P_H 3,8) und 300 mg Inulin auf 30 ccm aufgefüllt.

Zeit in Stunden	mg Cu	% Spaltung
0	—	—
3	22,5	20

Mit dem Ammoniak-Eluat aus 500 ccm Preßsaft habe ich in 48 Stdn. 25 g Inulin zu 95% gespalten.

Grad der Spaltung und Substratmaximum.

0,4218 g Inulin verloren beim Trocknen im Vakuum über P_2O_5 bei 78° in 1 Stdn. 0,0409 g = 9,7% Wasser. 2,0000 g Inulin hinterließen beim Verbrennen 0,0052 = 0,26% Asche. Unter genauer Einrechnung dieser Fremdbestandteile wurde folgender Ansatz zusammengestellt:

10 ccm Phosphat-Eluat, 20 ccm Wasser, 300 mg Indulin. 5 ccm wurden titriert.

Zeit in Stdn.	mg Cu	mg Fruktose	% Spaltung
0	—	—	—
24	94,5	52,5	95

Unter Berücksichtigung der Tatsache, daß in jede C_6-Gruppe des Inulins bei der Hydrolyse ein Molekül Wasser eintritt, ergibt sich, daß statt 55 mg nur 52,5 mg Fruktose, nämlich 95% der ursprünglich in 5 ccm vorhandenen 50 mg Inulin entstanden sind.

Zur annähernden Bestimmung der spaltbaren Maximalmenge Inulin diente folgender Ansatz:

5 ccm Phosphat-Eluat, 5 ccm Stammpuffer von P_H 3,8 (52 Teile n/10 Kalium-Citrat und 48 Teile n/10 HCe), 600 mg Inulin und 50 ccm Wasser.

Zeit in Stunden	mg Cu	% Spaltung
0	—	—
48	94,5	95

Da die mit 5 ccm Preßsaft gegebene Inulinase-Einheit in den 500 ccm Fermentextrakt einer Pilzzüchtung 100mal enthalten ist, so ist man imstande, mit dieser in 48 Stdn. 60 g Inulin zu spalten.

Bestimmung der Glucose.

10 ccm des rohen Fermentsaftes wurden mit 300 mg Inulin versetzt und auf 30 ccm aufgefüllt. Nach 48stündigem Stehen bei 38° wurden 10 ccm nach der Methode von Willstätter und Schudel titriert. Verbrauch an n/10 Jodlösung: 0,66 ccm (weiterer Wert: 0,66 ccm).

2. 10 ccm Preßsaft wurden mit Wasser auf 30 ccm aufgefüllt. Nach 48 Stn. verbrauchten 10 ccm davon 0,20 ccm n/10 Jodlösung (weiterer Wert: 0,22 ccm).

3. 10 ccm einer 1,05%igen Fruktoselösung von P_H 3,8 (1 ccm Stammpuffer Citrat-Salzsäure) verbrauchten nach 48 Stdn. 0,3 ccm n/10 Jodlösung (weiterer Wert: 0,28 ccm, 0,31 ccm).

Subtrahiert man die durch Ferment und Fruktose entstandenen Fehler vom Gesamtjodverbrauch, so bleibt ein Rest von 0,16 ccm, der 1,45 mg Glucose entspricht. 1,45 mg Glucose sind 1,4% des zur Spaltung verwandten Inulins.

Zur genauen Bestimmung der Glucose wurde die Hauptmenge der Fruktose auf folgende Weise entfernt: Ein Inulinhydrolysat aus 20 g Inulin, das in 2 l 19,01 g Hexosen enthielt, wurde mit Ammoniak auf eine Acidität von pH 5,2 gebracht und dann im Vakuum auf 200 ccm eingeengt. Die Phosphorsäure des Puffers fällte ich durch Schütteln mit 1 g Silbercarbonat und das Silber durch H_2S in der mit Essigsäure angesäuerten Lösung. 100 ccm der eingedampften Flüssigkeit ließen mit 200 ccm Alkohol die Eiweißstoffe der Fermentlösung fallen, von der Abwesenheit reduzierender Substanzen im Niederschlag überzeugte ich mich mittels Fehlingscher Lösung. Das Filtrat engte ich zum Syrup ein und kochte die Zucker zur Entfernung der Asche mit 300 ccm Methylalkohol aus. Die filtrierte methylalkoholische Lösung enthielt, wie ich durch Titrieren eines aliquoten Teiles mit Fehlingscher Lösung ermittelte, 19,01 g Hexosen (auf Fruktose berechnet). Sie wurden zum steifen Syrup eingeengt und mit Fruktose beimpft. Nach 12tägigem Stehen bei Zimmertemperatur war die Krystallisation beendet; ich rührte die Krystalle mit Aethylalkohol an und trennte sie durch Abnutschen von der Mutterlauge. So gewann ich 15,6 g krystallisierte Fruktose. 5 ccm einer 1%igen Lösung gaben 87,1 mg Cu entsprechend 48,2 mg Fruktose. Die Lösung zeigte $\alpha = -0{,}89^0$. Demnach fanden sich als spezifische Drehung der Fruktose -93^0. Genau dieselben Zahlen erhielt ich mit getrockneter reinster Fruktose von Kahlbaum, wenn ich durch Wägung eine 1%ige Lösung herstellte. In 19,01 g Hexose waren unter Berücksichtigung der 1,4% g Glucose 18,79 g Fruktose enthalten, so daß ich also mit 15,6 g 83% von dieser krystallinisch gewonnen habe.

Die alkoholische Mutterlage, durch mehrmaliges Abdampfen mit Wasser vom Alkohol befreit und schließlich mit Wasser auf 400 ccm gebracht, wurde nach Bertrand titriert. 5 ccm verbrauchten 12,5 ccm n/10 Permanganat, diese entsprechen 79,5 mg Cu. Nun ergibt sich aus den folgenden Versuchen, daß in 5 ccm 3,6 mg Glucose enthalten waren, die aus Fehlingscher Lösung 7,7 mg Cu als Oxydul

abscheiden. Der Rest von 71,8 mg Cu kommt auf 39,2 mg Fruktose, d. h. in den 400 ccm alkoholischer Mutterlauge waren 3,136 g Fruktose gelöst. Da sich aber im Syrup vor der Kristallisation 19,01 g Hexose befanden, von denen 98,5% oder 18,7 g Fruktose waren, so ergibt auch diese indirekte Bestimmung, daß dieser Zucker zu 83% auskrystallisiert war. In zwei anderen Spaltungsversuchen mit 10 g amerikanischem Inulin resp. 20 g Inulin von Kahlbaum gewonnen, waren 80 g bzw. 84% der fermentativ gebildeten Fruktose in Krystallen vom gleichen Reinheitsgrade. Das Drehungsvermögen der wässrigen Mutterlauge betrug im dm-Rohr —0,67°.

Unter Annahme von 1,5% Glukose (vgl. auch nachher), ber. auf 19,01 g, waren neben den 3,136 g Fruktose 0,288 g Glucose vorhanden, in 5 ccm also neben 39,2 mg der Ketose 3,6 mg der Aldose. Nun drehen 3,6 mg Glucose in dm-Rohr + 0,04°. Das Drehungsvermögen von 39,2 mg Fruktose — in 5 ccm Wasser — beträgt dagegen —0,72°. Die Summe der Drehungen —0,68° stimmt gut mit der beobachteten Drehung —0,67° überein, so daß sich auch aus den polarimetrischen Messungen die Bildung von 1,5% Glucose bei der Inulinhydrolyse ergibt.

Die Titration von 10 ccm der Mutterlauge nach Willstätter und Schudel ergab den Verbrauch von 1,05 ccm n/10 Jodlösung. Bei Einrechnung eines Fruktosefehlers (vgl. vorher) von 0,25 ccm bleibt ein Rest von 0,8 ccm, der 7,2 mg Glucose entspricht. In der Mutterlauge waren demnach 0,288 g Glucose bzw. ca. 1,44% vom Inulin.

Sämtliche Versuche wurden mehrfach auch mit dem amerikanischen Inulin aus Detroit ausgeführt. Bis auf die höhere Eigenreduktion dieses Inulins (5 ccm einer 1%igen Lösung verbrauchten 0,45 ccm n/10 Kaliumpermanganat gegenüber 0,2 ccm bei Kahlbaum-Inulin) verhielten sich beide Körper in den von mir untersuchten Eigenschaften gleich.

Diese Untersuchungen wurden in der Zeit von Oktober 1930 bis Februar 1932 an der Universität Berlin ausgeführt. Anregung und Unterstützung empfing ich von Herrn Professor Dr. Hans Pringsheim. Ich sage ihm dafür meinen ehrerbietigen Dank.

Lebenslauf.

Ich, Paul Ohlmeyer, wurde am 10. Januar 1908 als Sohn des Postamtmanns Heinrich Ohlmeyer und seiner Ehefrau Anna geb. Golze zu Münster in Westfalen geboren. Nach dreijähriger Vorbildung auf der Elementarschule besuchte ich das Gymnasium Paulinum in Münster, auf dem ich Ostern 1926 die Reifeprüfung bestand. Ich bezog die Universität Münster, studierte darauf in Wien und hörte seit dem Wintersemester 1929/30 an der Universität Berlin. Hier legte ich auch die Verbandsprüfung ab. Ich besuchte Vorlesungen der Herren Professoren Bodenstein, Franke, Leuchs, Pringsheim, Schenck, Schlenk, Smekal und Wegscheider.

Franz Linke, Buchdruckerei, Berlin NW 6, Marienstr. 13.